

# Nod1ないしNod2リガンドでプライムされたマウスでは様々なTLRリガンド刺激に対する腫瘍壊死因子(TNF- )およびIL-6産生が亢進する

著者	萩原 資久
号	77
学位授与番号	2510
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/45719">http://hdl.handle.net/10097/45719</a>

氏 名 (本籍)                    <sup>はき</sup>萩                    <sup>わら</sup>原                    <sup>とも</sup>資                    <sup>ひさ</sup>久

学 位 の 種 類                    博                    士                    ( 医                    学 )

学 位 記 番 号                    医 博 第                    2 5 1 0                    号

学位授与年月日                    平 成 19 年                    9                    月                    12                    日

学位授与の条件                    学位規則第 4 条第 1 項該当

研 究 科 専 攻                    東北大学大学院医学系研究科  
(博士課程) 医科学専攻

学 位 論 文 題 目                    Enhancement of tumor necrosis factor- $\alpha$  and  
interleukin-6 production in mice primed with  
Nod1- or Nod2-ligand in response to various  
Toll-like receptor ligands  
(Nod1ないし Nod2 リガンドでプライムされた  
マウスでは様々な TLR リガンド刺激に対する腫  
瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) および IL-6 産生が亢進す  
る)

(主 査)

論 文 審 査 委 員                    教授 里 見                    進                    教授 佐々木                    巖

教授 加 藤 正 人

# 論文内容要旨

## 【緒言】

ペプチドグリカン (PGN) はマイコプラズマを除き、ほとんどすべての細菌種の細胞壁の骨格構造をなす成分である。PGN は *N*-アセチルグルコサミンと *N*-アセチルムラミン酸が結合したグリカン鎖に、ペプチド (軸ペプチド) が結合し、軸ペプチド間に架橋構造を有する網状構造の巨大分子である。PGN の免疫生物学的活性については長年研究されてきたが、近年、微生物に特有の分子構造をパターン認識して生体防御を担う自然免疫の研究が進み、その過程で、PGN の部分構造をパターン認識する nucleotide-binding oligomerization domain (Nod) ファミリー分子が細胞内受容体であることが証明された。すなわち、Nod1 はグラム陰性菌や一部のグラム陽性菌の PGN に特有の *meso*-diaminopimelic acid (*meso*-DAP) を含むペプチド構造を認識し、Nod2 はグラム陽性菌と陰性菌両方の PGN の要構造にあたるムラミルジペプチド (MDP; *N*-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine あるいは D-glutamic acid) を認識する。一方、Toll 様受容体 (TLR) は、10 余種が知られ、細菌・ウィルス・真菌等の微生物をパターン認識する。MDP を前投与 (プライム) されたマウスでは、TLR4 リガンドのエンドトキシン [lipopolysaccharide (LPS) ないしその活性中心の lipid A] に対する感受性が亢進して、腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) や interleukin (IL)-6 などの炎症性サイトカイン応答が高まることが知られている。本研究では Nod2 リガンドの合成 MDP に加えて、合成 Nod1 リガンドである FK156 (D-lactyl-L-alanyl- $\gamma$ -D-glutamyl-*meso*-DAP-glycine) および FK565 (heptanoyl- $\gamma$ -D-glutamyl-*meso*-DAP-D-alanine) にもこのようなプライミング作用が認められるかどうか、さらに、Nod1/2 リガンドによるプライミング作用の諸条件を検討し、その作用機序の解明を目指した。

## 【材料と方法】

1) 微生物関連のテスト標品: Nod1 リガンドとして FK156 および FK565 (以上、アステラス製薬より分与)、Nod2 リガンドとして MDP を供試した。一方、TLR リガンドとしては、TLR2/1 リガンドの大腸菌型合成トリアシルリポペプチド Pam<sub>3</sub>CSSNA, TLR2/6 リガンドのマイコプラズマ型ジアシルリポペプチド FSL-1, TLR3 リガンドの poly I:C, TLR4 リガンドの大腸菌型合成 lipid A (LA-15-PP) ならびに細菌性 LPS (*E. coli* O55:B5 由来), TLR9 リガンドの CpG DNA (1668 と 2006) を供試した。2) 血清 TNF- $\alpha$  および IL-6 誘導: FK565, FK156, ないし MDP をマウスに様々な投与経路 (多くは尾静脈注射) で前投与 (プライミング) して、その後 0-12 時間 (多くは 4 時間) 後に種々の TLR リガンドを尾静脈投与 (惹起注射) した。惹起注射の 90 分後に麻酔下にて心臓採血をし、血清中の TNF- $\alpha$  および IL-6 濃度を

ELISA 測定した。3) 各臓器における TNF- $\alpha$  および IL-6 mRNA 発現：マウスに FK 565 ないし MDP をプライミング後、LPS による惹起注射を行い、その 0, 30, 60, 90 分後に肝臓・脾臓・肺・末梢血単核細胞をそれぞれ回収し、Total RNA を抽出した。逆転写反応を行い、Real-time PCR 法にて、TNF- $\alpha$  および IL-6 mRNA 発現を分析した。4) 肝臓における phospho-IKK  $\alpha/\beta$  分子発現：マウスに FK 565 および MDP をプライミング後、LPS による惹起注射を行い、その直後と 10 分後に肝臓を回収し、4 %パラホルムアルデヒドにて固定、パラフィン包埋を行い、組織切片を抗 phospho-IKK  $\alpha/\beta$  モノクローナル抗体で免疫組織学的に検討した。

## 【結 果】

1) Nod2 リガンドの MDP および Nod1 リガンドの FK 156 および FK 565 をプライムしたマウスでは、LPS 投与に応じて高レベルの TNF- $\alpha$  産生が認められた。特に FK 565 では MDP (10  $\mu$ g/mouse が至適) のわずか 1 万分の 1 量 (1 ng/mouse) でも強力な作用を発揮した。2) FK 565 および MDP のプライミング作用は惹起注射との投与間隔が 4 時間のときに最も強く認められ、FK 565 の場合には 12 時間後でも有意なプライミング作用が認められた。3) FK 565 および MDP は静脈投与以外にも筋肉内、皮下、腹腔内といった様々な投与経路でもプライミング作用を示すことが証明された。MDP および FK 565 とともに静脈投与の 10 倍量を経口投与すると明確なプライミング作用が認められた。4) このような Nod 受容体を介したプライミング作用は TLR4 リガンドである LPS や lipid A ばかりではなく、TLR2 リガンドであるリポペプチドおよび TLR3 リガンドである poly I:C に対しても認められた。5) MDP 誘導体では TLR2 および TLR4 に作用するとの報告もあるので、TLR2 KO マウスならびに TLR4 変異マウスである C3H/HeJ マウスを供試して、MDP のプライミング作用を検討したが、TLR2 および TLR4 に非依存的にプライミング作用が認められた。6) FK 565 および MDP でプライムしたマウスは LPS 投与後に肝臓、脾臓、肺など様々な臓器で TNF- $\alpha$  および IL-6 mRNA を高発現していたが、末梢血単核細胞ではほとんど増強は認められなかった。7) FK 565 および MDP でプライムしたマウスでは LPS 投与後の肝臓組織標本では phospho-IKK  $\alpha/\beta$  が強く発現していた。

## 【考 察】

以上の知見はマウスにおいて Nod1 ないし Nod2 を介するプライミング作用は様々な TLR 系リガンド応答に及ぶことを示している。TLR 系シグナル伝達経路と Nod 系シグナル伝達経路が交差すると考えられる IKK 複合体の活性化を示唆する所見が得られたので、両経路のクロストークによる強力な NF- $\kappa$ B 活性化が、様々な臓器に誘導されているものと推測される。Nod1/2 のリガンド構造は細菌に普遍的な構造であること、宿主は常に細菌と共生していることをあわせ考えると、宿主は常に Nod1/2 を介してプライムされた状況にあり、自然免疫ばかりでなく獲得免疫もこのようなプライミングを前提として解釈する必要があるとも言えよう。

## 審査結果の要旨

自然免疫研究の進展により、Toll 様受容体 (TLR; Toll-like receptor) をはじめとした受容体についての解析が盛んに行われてきた。TLR はこれまでに 10 余種が知られ、細菌・ウィルス・真菌等の微生物をパターン認識する。一方、細胞内の nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) ファミリー分子が殆ど全ての細菌種の細胞壁の骨格構造をなす成分であるペプチドグリカン (PGN) の部分構造を認識することが明らかになり、NOD1 がグラム陰性菌や一部のグラム陽性菌の PGN に特有の *meso*-diaminopimelic acid (*meso*-DAP) を含むペプチド構造を認識し、NOD2 はグラム陽性菌と陰性菌両方の PGN の要構造にあたる muramyl dipeptide (MDP) を認識することが分かってきた。NOD2 が同定される以前から MDP を前投与 (プライム) されたマウスでは、エンドトキシン (TLR4 リガンドの LPS ないしその活性中心の lipid A) に対する感受性が亢進して、TNF- $\alpha$  や IL-6 などの炎症性サイトカイン応答が高まることが知られていたが、本研究では合成 MDP に加えて、合成 NOD1 リガンドの FK 156 および FK 565 においても同様なプライミング作用が引き起こされることを示し、その反応の諸条件と作用機序について検討している。

まず、C57BL/6 マウスに対して、MDP ないし FK 156, FK 565 を静脈投与した後、LPS を投与して、血清中の TNF- $\alpha$  および IL-6 を測定し、さらに前投与から惹起注射までの投与間隔によるプライミング作用の変化を検討した。MDP だけでなく FK 156 と FK 565 にもプライミング作用が認められ、各 NOD リガンドの前投与から惹起注射まで投与間隔は 4 時間が至適で、FK 565 はわずか 1 ng/mouse で MDP の至適投与量 (10  $\mu$ g/mouse) に匹敵するプライミング作用を発揮することが明らかになった。次に、FK 565 と MDP を静脈投与以外の投与経路で前投与してプライミング作用が認められるか検討した。各 NOD リガンドのプライミング作用は静脈投与以外にも、筋肉内、腹腔内、皮下、経口といった様々な投与経路による前投与でも引き起こされることが分かった。さらに、プライミング後の惹起投与が合成 TLR4 リガンドの lipid A のみでなく、合成 TLR2/6 リガンドの lipopeptide や合成 TLR3 リガンドの poly I:C でも認められることが明らかになった。そして、FK 565 ないし MDP を前投与したマウスでは、LPS 投与後に肝臓、脾臓、肺で TNF- $\alpha$  および IL-6 mRNA の高発現が認められ、さらに、転写因子 NF- $\kappa$ B を活性化するシグナル分子である phospho-IKK  $\alpha/\beta$  発現が、FK 565 と MDP 前投与後に LPS 投与したマウスの肝臓で著明に増強していた。

これらの結果から、マウスにおける NOD1 ないし NOD2 を介するプライミングは様々な投与経路によって引き起こされ、さらに様々な TLR リガンドによって惹起されることが明らかになった。また、これらに IKK 複合体の活性化が関与する可能性が示唆された。

これらの知見はこれまで報告されてきたプライミング作用に対して新たな見解を示すものと考えられる。よって、本論文は博士 (医学) の学位論文として合格と認める。